

学校编码: 10384

分类号密级

学号: 21620111152416

UDC

厦门大学

硕士学位论文

杂色鲍 abTIS11 基因克隆、表达特性及其功能的初步研究

Cloning, expression pattern and functional studies of

abTIS11 in *Haliotis diversicolor*

任世盈

指导教师姓名: 周涵韬教授

王克坚教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2014 年 8 月

论文答辩时间: 2014 年 8 月

学位授予日期: 2014 年 9 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 8 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在（周涵韬、王克坚）导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（王克坚）课题（组）的研究成果，获得（王克坚）课题（组）经费或实验室的资助，在（王克坚）实验室完成。

（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

缩略词中英文对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
TIS11	the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) inducible sequence 11	TPA 能够诱导的第 11 个序列
AREs	AU-rich elements	富含 AU 的基序
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA)或 Phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)	佛波酯
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
Ct	Cycle threshold	阈值循环数
H	Hour	小时
min	Minute	分钟
S	Second	秒
rpm	Round per minute	每分钟转速
kD	Kilodalton	千道尔顿
bp	Base pair	碱基对
His	Histidine	组氨酸
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使 RNA
ORF	Open reading frame	开放阅读框
EB	Ethidium bromide	溴化乙啶
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT	Reverse transcription	反转录
SDS-PAGE	SDS-polyacrylanide gel electrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝 胶电泳
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TEMED	tetramethylethylenediamine	四甲基二乙胺

目录

缩略词中英文对照表.....	A
摘要.....	i
Abstract.....	I
第一章 绪论.....	1
1 TIS11 家族研究进展	1
1.1 TIS11 家族的发现	1
1.2 TIS11 家族的结构特征和分类	2
1.3 TIS11 家族的功能	3
2 两种 ARE-mRNA 的概述	9
2.1 AP-4	9
2.2 Catalase	10
3 研究目的和意义.....	11
4. 技术路线.....	12
第二章 杂色鲍 <i>abTIS11</i> 基因克隆与序列分析.....	13
2.1 材料.....	13
2.2 方法	16
2.3 结果	26
2.3.1 杂色鲍 <i>abTIS11</i> 的全长 cDNA 序列的扩增结果.....	26
2.3.2 <i>abTIS11</i> 序列分析	29
2.3.3 <i>abTIS11</i> 基因组 DNA 序列的扩增结果.....	33
2.3.4 <i>abTIS11</i> 上游调控序列的活性研究	35
2.4 讨论	38
第三章 <i>abTIS11</i> 多克隆抗体的制备及在杂色鲍各组织器官的表达特性.....	41
3.1 材料.....	41

3.2 方法.....	44
3.3 结果.....	52
3.3.1 选取 <i>abTIS11</i> (565-744)及其扩增结果	52
3.3.2 构建的 pET-28a/ <i>abTIS11</i> (565-744)表达载体.....	53
3.3.3 <i>abTIS11</i> (565-744)蛋白在 BL21(DE3)菌株中的表达	54
3.3.4 <i>abTIS11</i> (565-744) 蛋白的纯化	55
3.3.5 <i>abTIS11</i> 的多克隆抗体效价和特异性分析	55
3.3.6 Real-Time PCR 检测 <i>abTIS11</i> 基因在各组织器官中的表达特性	56
3.3.7 Western blotting 检测 <i>abTIS11</i> 蛋白在杂色鲍各组织中的表达特性	58
3.4 讨论.....	58
第四章 <i>abTIS11</i> 功能的初步研究.....	60
4.1 材料与仪器	60
4.2 方法.....	61
4.3 结果.....	67
4.3.1 从 NCBI 库中找到的 ARE-mRNA	67
4.3.2 <i>AP4</i> 和 <i>Catalase</i> 基因扩增效率和扩增产物特异性分析	67
4.3.3 PMA 处理鲍血淋巴细胞, <i>abTIS11</i> 的表达.....	68
4.3.4 PMA 处理鲍血淋巴细胞后, <i>AP4</i> 和 <i>Catalase</i> 的表达.....	69
4.3.5 <i>abTIS11</i> RNAi 后, <i>AP4</i> 和 <i>Catalase</i> 的表达.....	70
4.4 讨论.....	71
结语	74
参考文献.....	77
在学期间参加的科研项目及成果	85
致谢	86

CONTENTS

List of abbreviation	A
Abstract in Chinese	i
Abstract in English.....	I
Chapter 1 Introduction	1
1 Advances on the study of TIS11 family members	1
1.1 zinc finger protein	1
1.2 TIS11 family members.....	2
1.3 The role of TIS11 family members	3
2 The overview of AP-4 and Catalase.....	9
2.1 AP-4	9
2.2 Catalase	10
3 Purpose and significance of this study	11
4. Technical route of this study	12
Chapter 2 Gene cloning and sequence analysis of abTIS11 identified from <i>Haliothis diversicolor</i>.....	13
2.1 Materials.....	13
2.2 Methods.....	16
2.3 Results	26
2.3.1 The all sequence of abTIS11 cDNA	26
2.2.2 The analysis of abTIS11 sequences	29
2.3.3 The genomic sequence of abTIS11	33
2.3.4 Transcription activity of abTIS11 5' flanking sequence	35
2.4 Discussion	38

Chapter 3 preparation and analysis of abTIS11 polyclonal antibody and tissue-specific constitutive expression of abTIS11 in *Haliotis diversicolor*..... 41

3.1 Materials.....	41
3.2 Methods.....	44
3.3 Results	52
3.3.1 Cloning of <i>abTIS11</i> (565-744) which is partial sequence of abTIS11	52
3.3.2 Preparation of pET-28a expression vector and <i>abTIS11</i> (565-744)	53
3.3.3 Expression of abTIS11(565-744) in BL21(DE3).....	54
3.3.4 Purification of abTIS11 (565-744) expressed in BL21(DE3).....	55
3.3.5 Preparation and analysis of abTIS11 polyclonal antibody.....	55
3.3.6 Tissue-specific constitutive expression of abTIS11 mRNA in <i>Haliotis diversicolor</i>	56
3.3.7 Tissue-specific constitutive expression of abTIS11 protein in <i>Haliotis diversicolor</i>	58
3.4 Discussion	58

Chapter 4 The functional study of abTIS11 60

4.1 Materials.....	60
4.2 Methods.....	61
4.3 Results	67
4.3.1 Getting ARE-mRNAs from NCBI	67
4.3.2 Gene amplification efficiency and specificity analysis of AP-4 and Catalase in Real-time PCR.....	67
4.3.4 abTIS11 expression following the challenging of PMA in <i>Haliotis diversicolor</i> hymocyte.....	68
4.3.4 AP-4 and Catalase expression following the challenging of PMA in <i>Haliotis diversicolor</i> hymocyte	69
4.3.5 The expression of AP-4 and Catalase when abTIS11 was knocked	

down by its specific dsRNA	70
4.4 Discussion	71
Summary	74
References	77
Research projects involved and papers published	85
Acknowledgements.....	86

摘要

杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 是我国重要的海水养殖经济物种, 以其丰富的营养价值深受民众喜爱, 尤其在在我国南方沿海海域得到广泛的养殖。但近年来人工养殖杂色鲍疾病频发, 给养鲍业带来很大的经济损失。而关于鲍病害方面的研究报道比较少, 到目前为止还没有合适的药物和治疗方法治疗鲍疾病。所以, 从生物化学与分子水平来研究鲍的病因, 寻找其中的重要致病因子或者调控因子, 成为当前寻找鲍疾病防治的方法之一。本实验室近年来在鲍的免疫和凋亡方面开展了许多工作, 在前期构建杂色鲍血淋巴细胞 SSH cDNA 文库基础上, 筛选获得了一个与哺乳动物 TIS11 基因家族 (the 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate(TPA) inducible sequence 11 family) 具有较高同源性的基因片段 TIS11FPL (TIS11 family like protein), 命名为 *abTIS11*。已知 TIS11 家族成员具有保守结构域——两个串联的锌指结构, 在转录后调控方面起着重要作用, 能够通过识别、结合并降解 ARE-mRNA, 调控细胞的免疫、炎症或者凋亡等。鉴于此, 研究 *abTIS11* 在鲍体内的分子机制具有科学意义。

杂色鲍 *AP-4* mRNA 和 *CAT* mRNA 属于第 V 类 ARE-mRNA, 在哺乳动物中, 有研究表明 *AP-4* 与免疫、凋亡相关; *Catalase* 主要与氧代谢和细胞死亡相关。

本项研究克隆获得了杂色鲍 *abTIS11* cDNA 及基因组 DNA 序列, 阐明了基因组 DNA 结构。扩增了 *abTIS11* 5'侧翼序列, 预测了其启动子结合位点, 并研究了启动子活性。制备了 *abTIS11* 多克隆抗体, 从基因水平和蛋白水平检测了 *abTIS11* 在杂色鲍各组织器官中的表达特性。在此基础上, 初步研究了 *abTIS11* 的潜在功能, 发现 *abTIS11* 的表达与 ARE-mRNA 成员 *AP-4* 和 *Catalase* 的表达有关联性, 预示 *abTIS11* 的功能可能与炎症、免疫、凋亡等相关。本研究的主要结果及结论如下:

- 1、基因克隆获得了杂色鲍 *abTIS11* cDNA 及基因组 DNA 序列: 利用 PCR 和 RACE 技术克隆获得了 *abTIS11* cDNA 全长序列, 全长 2111 bp, ORF 框 1251 bp, 编码 416 个氨基酸, 其中 Ser 含量最高, 达到 17.3%。以杂色鲍外套膜 DNA 为模板, 克隆得到了 2269 bp *abTIS11* DNA 序列, 由两个外显子 (分别为 51 bp、

1200 bp) 和一个内含子组成 (157 bp)。

2、*abTIS11* 5'-侧翼序列扩增与启动子活性研究: 通过基因步移法, 获得 693bp 的 *abTIS11* 5'-侧翼序列, 该序列包括 76 bp *abTIS11* cDNA 序列, 617 bp 的 5'侧翼区。用荧光蛋白和双荧光素酶报告基因检测 *abTIS11* 上游调控序列具有转录调节活性。将 *abTIS11* 上游进行分段扩增, 进一步研究 *abTIS11* 的启动子活性。经分析发现-593~-419 之间和-319~-142 之间的某些假定启动子结合位点可能具有活性。在-593~-419 之间具有 CES2.01、TGIF 等假定启动子结合位点; 在-319~-142 之间具有 SN.02 (2 个)、CES2.01、KR.01、ELF1.01、BEAF32.01、MAB3.01、PAX6-HD.01 等假定启动子结合位点。这些假定启动子一般与细胞生长、分化、免疫或者凋亡相关。

3、制备 *abTIS11* 多克隆抗体: 构建 pET-28a 原核表达载体, 将表达质粒转化 BL21(DE3)表达菌株, 0.6 mM IPTG 诱导表达 6 h。表达产物以可溶性形式表达, Ni 柱亲和层析方法纯化获得目的蛋白。纯化的目的蛋白免疫小鼠, 制备 *abTIS11* 多克隆抗体, 该抗体滴度为 1: 6400 且具有特异性, 可以进行后续实验研究。

4、揭示 *abTIS11* 在杂色鲍各组织器官的表达特性: Real-time PCR 检测结果表明: *abTIS11* mRNA 在各组织均有表达, 在粘液腺、性腺中的表达量相对较高, 其次分别是上足、鳃、肾脏、外套膜、肝胰腺、闭壳肌, 在血淋巴细胞表达量最低。Western blotting 检测结果表明: *abTIS11* 蛋白在鳃中高表达, 其次是肾和粘液腺, 其它组织没有检测到 *abTIS11* 蛋白。

5、初步研究 *abTIS11* 与 *AP4* 和 *Catalase* mRNA 的相关性: 用 160 nM PMA 刺激鲍血淋巴细胞, Real-time PCR 检测分析发现 *abTIS11* 表达水平显著上调; 而 *AP4* 相对于对照组显著下调; *Catalase* 相对于对照组显著下调。*abTIS11* RNAi 后, *AP4* 和 *Catalase* 的表达水平分别于 3 h, 6 h 后显著上调。说明 *abTIS11* 具与 *AP4* 和 *Catalase* 表达的呈负相关。*TIS11* 家族蛋白及类 *TIS11* 家族蛋白具有通过结合并降解 ARE-mRNA, 调节细胞免疫与炎症或凋亡的作用。*abTIS11* 属于类 *TIS11* 家族蛋白, *AP-4* mRNA 和 *Catalase* mRNA 属于 ARE-mRNA。由此推测 *abTIS11* 可能参与 *AP-4* 和 *Catalase* mRNA 的降解过程, 进而调控细胞的免疫、凋亡、氧代谢或死亡。本实验为 *abTIS11* 机理的研究奠定了基础, 为鲍免疫或凋

亡信号通路的研究及鲍疾病的防治提供了新的思路。

关键词：杂色鲍； abTIS11； AER-mRNA； AP-4； Catalase

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Haliotis diversicolor is a economically important seafood in aquaculture worldwide, deeply loved by people because of its nutritional value, which is widely farmed especially in the coastal waters of Southern China. But in recent years, the disease of farmed abalone happened frequently and enormously and caused great economic loss for abalone industry. What's worse, there is not right drug or therapeutic method. Therefore, to study the cause of abalone disease in biochemistry and molecular level and to find the important regulatory factor or virulence factor become one way of disease prevention and treatment. Our laboratory has done a lot of work about immunity and apoptosis of *Haliotis diversicolor*, we choosed TIS11FPL (TIS11 family like protein), which now is called abTIS11, from *Haliotis* blood lymphocytes SSH cDNA library that has been builded before. TIS11 protein family (the 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) inducible sequence 11 family) belongs to C3H-type zinc finger protein, have the same conserved region-two zinc finger structures in series. TIS11 family proteins belonging to trans-acting factors, can identify and bind homeopathic components-AREs to accelerate ARE-mRNA degradation. They can regulate stability of mRNA that mostly associated with immunity, inflammation, apoptosis and so on. Therefore, studying the molecular mechanism of abTIS11 in *Haliotis diversicolor* has scientific significance.

AP-4 mRNA and *CAT* mRNA of *Haliotis diversicolor* are ARE-mRNAs. In mammals, *AP-4* is important in immunity and apoptosis; Catalase plays important role in cell death and Oxygen metabolism.

This study cloned the *abTIS11* cDNA and genomic DNA sequences to clarify its genetic structure; amplified *abTIS11* 5'-flanking sequence, which had transcriptional regulatory activity, to explore its transcriptional activity; prepared abTIS11's polyclonal antibodies, detected expression pattern of abTIS11 in various tissues from gene and protein levels; stimulated abalone blood cells with PMA, then *abTIS11* was

induced, but the mRNA of *AP-4* and *Catalase* that belong to ARE-mRNA decreased. When abTIS11 was knocked down by its specific dsRNA, the mRNA of *AP4* and *Catalase* increased. The main results and conclusions of this study are as follows:

1. We obtained the full length cDNA and genomic DNA sequence of abTIS11 from *Haliotis diversicolor* hemocyte: we used 5' rapid amplification of cDNA ends(RACE)PCR, obtained the full length of cDNA of abTIS11, and it was consisted of 2111 nucleotides, encoding a polypeptide of 416 amino acids including 17.3% Ser which was highest in quantity. Genomic DNA was extracted in *Haliotis* mantle, and then as a template to amplify abTIS11 genomic sequence (2269 bp). abTIS11 genomic DNA sequence contains two exons and one intron.

2. Amplificate the 5'-flanking sequence and analysis promoter activity: We get 693 bp 5'-flanking sequence of abTIS11 using Genome Walking Kit. It includes a 76 bp noncoding region and a 617 bp putative promoter. We constructed four serial deletion plasmids based on the firefly luciferase reporter vector pGL3-basic. Deletion from -593 to -419 and -419 to -142 resulted in increased luciferase activities in transfected EPC cells. There are CES2.01 and TGIF binding sites from -593 to -419; There are SN.02、CES2.01、KR.01、ELF1.01、BEAF32.01、MAB3.01 and PAX6-HD.01 binding sites from -319 to -142. These binding sites involed in development, differentiation immunity or apoptosis.

3. Preparation of abTIS11 polyclonal antibodies: We selected a gene fragments of *abTIS11* to reconstruct pET-28a expression vector. The expression plasmid was transformed into BL21 (DE3), and protein expressed by IPTG induction. The protein existed mainly in the state of the soluble, purified by affinity chromatography. We used purified protein to immunize mice to get abTIS11 polyclonal antibodies.

4. Detected expression pattern of abTIS11 in each organization. The Real-time PCR result was that *abTIS11* was expressed in every tissue, the higher expression was in the mucus glands, the lower was in hemocyte. The Western blotting results was that the highest expression was in the gills, followed by the kidney and mucous glands,

and was not detected in the rest.

5. Studied the relationship between abTIS11 and *AP4* or *Catalase* mRNA initially: We stimulated *Haliotis diversicolor* hemocyte with 160 nM PMA for 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h. abTIS11 was up-regulated at every time points. Under the same conditions, *AP-4* mRNA and *Catalase* mRNA were decreased. When abTIS11 was knocked down by its specific dsRNA, *AP-4* mRNA and *Catalase* mRNA were increased. TIS11 family protein have the ability of degrading ARE-mRNAs. abTIS11 is TIS11 family like protein. *AP-4* mRNA and *Catalase* mRNA are ARE-mRNAs. We speculated that abTIS11 can regulate the stabilization of *AP4* and *Catalase* mRNA.

Keywords: *Haliotis diversicolor*; abTIS11; ARE-mRNA; AP-4; Catalase

第一章 绪论

鲍属于无脊椎动物中的软体动物门 (Mollusca), 腹足纲 (Gastropoda), 前鳃亚纲 (Prosobranchia), 原始腹足目 (Archaeogastropoda), 鲍科 (Haliotidae)。鲍味道鲜美, 营养丰富, 被称为“海味珍品之冠”。鲍肉利肠、滋阴、壮肾, 从鲍肉中提取鲍灵素 I 和鲍灵素 II, 对抑制肿瘤具有明显的效果; 壳有明目降血压之功能。因此, 鲍既是营养食品又是珍贵的海洋药物。杂色鲍肉味鲜美独特, 倍受南方消费者的喜爱, 主要局限在不适皱纹盘鲍渡夏的广东和海南养殖^[1]。近年来随着养殖规模的扩大、集约化程度的提高及沿海水质的日趋恶化, 使得鲍病频频发生, 给养殖生产造成巨大的经济损失^[2]。由于病害方面的基础研究薄弱, 当鲍流行病暴发时, 没有合适的药物来治疗疾病, 加重了鲍的病状引起死亡, 使得经济损失更加惨重^[3]。而造成鲍病害的主要原因是病原菌或病毒的侵染。病原菌、病毒的感染易引起机体免疫或炎症反应, 细菌还能通过调节宿主的细胞凋亡实现其在宿主中的存活、扩散及繁殖。因此, 研究鲍疾病机理或者寻找鲍疾病相关的免疫、炎症、或凋亡因子, 通过调节这些因子治疗鲍疾病是一种有效的方法。TIS11 家族在转录后调控方面起着重要作用, 能够通过降解 ARE-mRNA 调节机体的炎症、免疫、凋亡等生命活动。

1 TIS11 家族研究进展

TIS11 家族是一类具有保守结构 (锌指结构) 的锌指蛋白; 分布广泛, 在脊椎动物、非脊椎动物、植物、真菌等生物中都有与该家族成员相似的蛋白; 具有调节机体免疫、炎症、凋亡等生命活动的作用。

1.1 TIS11 家族的发现

TPA(PMA)为一种促肿瘤生长剂, 1986 年 Lim RW、Varnum BC、Herschman HR 等人筛选出一种在含有 TPA 的培养基中不能生长的 Swiss 3T3 细胞, 用 TPA 刺激该细胞, 从中筛选出一批 RNA 水平显著上调而蛋白水平无变化的立早基因, 并将这些基因组建成一个 cDNA 文库, 目的是探索 TPA 的相关信号通路。他们

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库